

理化因子对红曲色素色价的影响及桔霉素的光降解性

张晓伟^{1,2}, 王昌禄^{1,*}, 陈勉华¹, 王玉荣¹

(1. 食品营养与安全教育部重点实验室, 天津科技大学食品工程与生物技术学院, 天津 300457;

2. 许昌学院食品科学与工程学院, 河南 许昌 461000)

摘 要: 采用紫外-可见分光光度法测定红曲色素在不同乙醇体积分数、温度、光照和pH值条件下色价的变化。结果表明: 红曲色素在80%乙醇、温度低于70℃、pH5~7的黑暗条件下最稳定; 强酸(pH2)、强碱(pH9~11)、高温(80~100℃)对红曲色素乙醇溶液都有较强的影响; 不同光源对红曲色素稳定性影响的结果表明: 日光对红曲色素的破坏作用最大, 黑暗、紫外和蓝光照射条件下红曲色素的稳定性无显著差异; 通过高效液相色谱法测定日光、蓝光、白炽灯光、紫外光4种光源处理对桔霉素标准品及红曲样品中桔霉素稳定性的影响, 结果表明: 紫外光处理5min后, 桔霉素标准品及红曲发酵样品中桔霉素保存率分别为56%和71%, 说明短时紫外光照射能够明显减少发酵产物中桔霉素的含量。

关键词: 红曲色素; 理化条件; 光降解性; 桔霉素

Physical and Chemical Factors Affecting the Stability of *Monascus* Pigments and Photocatalytic Degradability of Citrinin

ZHANG Xiao-wei^{1,2}, WANG Chang-lu^{1,*}, CHEN Mian-hua¹, WANG Yu-rong¹

(1. Key Laboratory of Food Nutrition and Safety, Ministry of Education, College of Food Engineering and Biotechnology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China; 2. College of Food Science and Engineering, Xuchang University, Xuchang 461000, China)

Abstract: The effects of different ethanol concentrations, temperature, light exposure and pH on the stability of *Monascus* red pigments were studied by means of UV-visible spectroscopy. Under the conditions of 80% aqueous ethanol solution, below 70 °C, pH 5–7 and darkness, the stability of *Monascus* red pigments was the best. In ethanol solutions, the pigments were seriously affected by strong acids (pH 2), strong alkalis (pH 9–11) and high temperatures (80–100 °C). Different light sources exerted diverse effects on these pigments. Sunlight caused the most serious damage to them, whereas their stability showed no apparent differences when exposed to UV light or blue light or in darkness. Meanwhile, the effects of sunlight, incandescent light, blue light and UV light on the stability of citrinin standard and extract from *Monascus* red pigments were analyzed by HPLC. After 5 min of UV illumination, 56% and 71% of the initial amount of citrinin remained in the two samples, respectively, indicating that citrinin can be degraded under short-time UV illumination.

Key words: *Monascus* pigments; physical and chemical conditions; photocatalytic degradability; citrinin

中图分类号: TS201.3

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2013)15-0017-05

doi:10.7506/spkx1002-6630-201315004

色素作为一种改善食品品质的重要添加剂, 在食品生产中被广泛使用。随着合成色素致癌、致突变等毒副作用的报道^[1-3], 开发营养、安全的天然食用色素成为热潮^[4-5]。红曲色素作为由红曲霉发酵产生的一种安全性

高、用途较广、色素种类较多的传统天然色素, 在东南亚已有几千年的应用历史。不仅可用于腐乳、红曲酒等传统食品产业, 还可以用于肉制品、鱼酱等现代食品产业中^[6]。红曲发酵产物除作为色素改善食品产品的感官效

收稿日期: 2013-06-19

基金项目: 国家自然科学基金项目(31171729)

作者简介: 张晓伟(1982—), 男, 博士研究生, 研究方向为食品微生物。E-mail: xiaoweizhang1982@163.com

*通信作者: 王昌禄(1960—), 男, 教授, 博士, 研究方向为食品生物技术。E-mail: clw123@tust.edu.cn

应外^[7], 还含有具有降血脂^[8-9]、降血压^[10-11]、抗肿瘤等方面的生理活性物质^[12-13], 丰富了食品的功能。但红曲色素的稳定性较差, 特别是光稳定性差, 货架期短, 含有对肾脏、肝脏有毒害功能的桔霉素^[14-15], 制约了我国红曲产品的生产和应用。如何提高红曲产品的稳定性^[16], 降低桔霉素在红曲产品中含量^[17-18], 成为国内外研究的热点之一。大量研究表明, 不同的理化因子对红曲色素溶液的稳定性有较大影响。有关桔霉素光降解方面的研究少有报道^[18]。本实验通过紫外-可见分光光度法对红曲色素在不同溶剂、温度、光照和pH值条件下的稳定性进行系统研究, 对桔霉素的光降解进行研究, 为探讨影响红曲色素稳定性的理化因素及桔霉素的光降解途径提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

红曲米由天津科技大学食品生物技术实验室自制。

ZKSY-Z水浴锅 郑州长城科工贸有限公司;
TDZ5-WS多管架自动平衡离心机 湖南湘仪实验室仪器开发有限公司; LabTech紫外-可见分光光度计 莱伯泰科仪器有限公司; LC-10ATVP型高效液相色谱仪 日本岛津公司。

1.2 菌种

Monascus 10保藏于天津科技大学食品生物技术实验室。

1.3 培养基

菌种保藏培养基: 可溶性淀粉50g、麦芽糖40g、蛋白胨30g、琼脂20g, 自来水1000mL, 121℃灭菌20min;
种子培养基: 大米粉30g、KH₂PO₄ 2.5g、NaNO₃ 2g、MgSO₄·7H₂O 1g, 自来水1000mL, 乳酸调pH值至4.5左右, 121℃灭菌20min。

1.4 方法

1.4.1 菌种的保藏

将红曲霉(*Monascus* 10)接种于菌种保藏培养基中, 37℃培养6~7d, 在4℃冰箱内保藏, 每隔15d活化1次。

1.4.2 红曲霉种子液的培养

将新鲜的菌种斜面加入5mL无菌水, 用孢子铲将斜面中的孢子刮掉, 制成菌悬液, 加入到50mL无菌种子培养基中, 37℃摇床培养24h, 得到种子液。

1.4.3 红曲米的培养

将市售大米100g浸泡约3h, 淘洗, 沥干水, 用电磁炉蒸半熟(10min左右), 冷却、打散后装于培养皿中, 每个培养皿10g左右, 121℃灭菌20min, 冷却后以10%接种量接种种子菌悬液, 37℃静置培养8d。培养过程中, 要定时添加适量无菌水, 保证红曲霉正常生长。待米粒中心无白心, 米粒为紫红或黑红色结束培养。60℃烘箱中烘干, 在暗处干燥环境中保存红曲米, 待用。

1.4.4 红曲色素的提取

经过研磨、过筛, 使红曲米粒度达到60目, 称取1.000g, 加50mL体积分数为80%的乙醇, 60℃保温浸提40min, 5000r/min离心20min, 上清液用真空旋转蒸发仪于40℃浓缩至干, 得红曲色素干粉约0.1g。

1.4.5 红曲色素稳定性

1.4.5.1 溶剂对红曲色素稳定性的影响

分别制备体积分数为20%、40%、60%、80%、100%的乙醇溶液备用。称取5份0.02g红曲色素干粉, 溶解在10mL不同体积分数乙醇溶剂中, 37℃水浴溶解1h, 用TDZ5-WS多管架自动平衡离心机5000r/min离心20min, 用紫外-可见分光光度计测定上清液在510nm波长处的吸光度。用其相对应的乙醇溶液调整样品吸光度相等, 约为0.800左右, 不同乙醇体积分数的红曲色素溶液各做3个平行实验。将已调整好浓度的红曲色素溶液放入37℃恒温培养箱中黑暗静置, 每隔一定时间测红曲色素溶液510nm波长处的吸光度, 以3个平行实验吸光度的平均值作为相应时间、相应乙醇体积分数条件下红曲色素溶液的吸光度。

1.4.5.2 温度对红曲色素稳定性的影响

取510nm波长处吸光度为0.736的80%乙醇溶液180mL, 等分在18个带塞比色管中(每管10mL), 将18个比色管随机分为6组(每组3个), 将6组红曲色素溶液分别放置于37、50、60、70、80、100℃恒温水浴箱中, 黑暗条件下静置, 每隔一定时间测其510nm波长处的吸光度, 以每组3个比色管吸光度的平均值作为相应时间相应温度条件下红曲色素溶液的吸光度。

1.4.5.3 pH值对红曲色素稳定性的影响

取510nm波长处吸光度为0.820的80%乙醇溶液150mL, 各取30mL, 分别用盐酸溶液与氢氧化钠溶液将其pH值调为2、5、7、9、11。将每份不同pH值的红曲色素溶液各取10mL, 分别装于25mL带塞比色管中(每管10mL), 作为不同pH值条件下的3个平行实验。将其全部放置于37℃恒温培养箱中黑暗条件下静置, 每隔一定时间测其510nm波长处的吸光度, 以各pH值条件下3个平行实验吸光度的平均值作为相应时间、相应pH值条件下红曲色素溶液的吸光度。

1.4.5.4 光照对红曲色素稳定性的影响

取510nm波长处吸光度为0.800的80%乙醇溶液120mL, 各取10mL, 分别装入12个直径为9cm的比色皿中, 随机分为4组(每组3个), 一组放于室外自然光下照射, 一组放于蓝色LED灯条件下照射, 一组放于紫外灯条件下照射, 一组放于黑暗条件下, 每隔20min测其510nm波长处的吸光度, 以每组3个比色皿吸光度的平均值作为相应时间、相应光照条件下红曲色素溶液的吸光度。

1.4.6 红曲米中桔霉素的提取

将经过研磨、过筛, 粒度达到60目的红曲米, 称

取5.000g,加25mL体积分数为80%的乙醇溶液,超声波提取30min,60℃水浴保温浸提60min,5000r/min离心20min,上清液经0.45 μ m的微孔滤膜过滤,滤液避光保存,用于分析实验。

1.4.7 光照对桔霉素稳定性的影响

取一定量的桔霉素标准品甲醇溶液及含有桔霉素的红曲米浸提液,分别放置于紫外光、日光、白炽灯、蓝光及黑暗条件下,每隔一定时间取样,采用高效液相色谱法测定桔霉素含量。

高效液相色谱仪:色谱柱:Shimadzu VP-ODS C₁₈(250mm \times 4.6mm,5 μ m);流动相:乙腈、甲醇、水体积比60:30:10(pH2.5);检测器:荧光检测器,检测波长为 λ_{Ex} =331nm, λ_{Em} =500nm;柱温:25℃;流速:1mL/min。

2 结果与分析

2.1 乙醇体积分数对红曲色素稳定性的影响

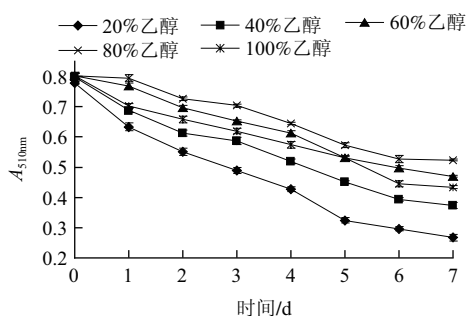


图1 乙醇体积分数对红曲色素稳定性的影响

Fig.1 Effect of ethanol volume fraction on the stability of *Monascus* pigments

由图1可知,红曲色素分别溶解在20%、40%、60%、80%、100%乙醇溶液中,放置7d后其色价保存率分别为34%、47%、59%、64%、54%,由此可知,红曲色素溶解在不同乙醇体积分数的溶液中其稳定性不同。Carvalho等^[19]发现,水分子能够与红曲色素发生反应,破坏红曲色素的酯键,从而使红曲色素发色团破坏,而在不同环境中这种反应的难易程度不同,乙醇溶液中这种破坏作用大大减弱。当红曲色素溶于80%乙醇溶液时最稳定,推测其原因主要是红曲色素溶于80%乙醇溶液时,其环境极性适度,水分子不易与红曲色素发色团发生反应而破坏红曲色素,当溶液极性过大或过小时都会引起红曲色素发色团的破坏。

2.2 温度对红曲色素稳定性的影响

由图2可知,在37~70℃范围内,随着温度的升高和时间的延长,红曲色素在510nm波长处的吸光度变化不大,当温度为37、50、60、70℃,起始吸光度为0.736,100min后分别为0.685、0.696、0.697和0.681,各测量结果

液在20、40、60、80、100min时吸光度分别是0.700、0.679、0.631、0.645和0.515;当温度为100℃,红曲色素溶液在20、40、60、80、100min时吸光度分别是0.588、0.518、0.448、0.377及0.322。由此可知,80℃后红曲色素溶液的吸光度随着时间的延长急剧降低,且随着温度的升高降低速率加快。由此说明,红曲色素在70℃以下时较稳定,不会随时间变化引起红曲色素的急剧降低,也不会随温度的升高而使红曲色素急剧降解;在80℃以上时,红曲色素会随着温度的升高加速降解。所以,红曲色素乙醇溶液应在70℃以下使用、保藏。

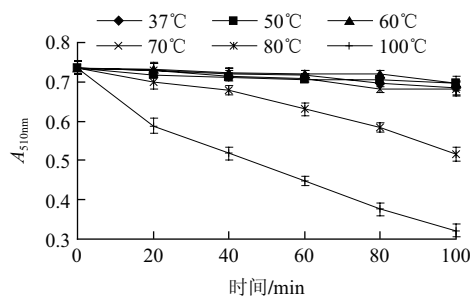


图2 温度对红曲色素稳定性影响

Fig.2 Effect of temperature on the stability of *Monascus* pigments

2.3 pH值对红曲色素稳定性的影响

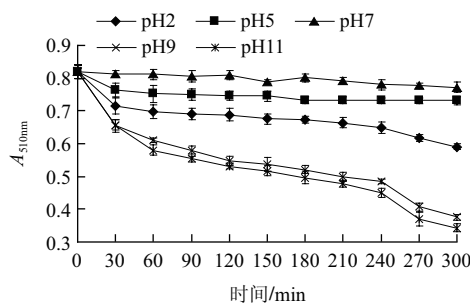


图3 pH值对红曲色素稳定性的影响

Fig.3 Effect of pH on the stability of *Monascus* pigments

由图3可知,当pH值为2、5、7、9、11时,初始吸光度为0.820的红曲色素80%乙醇溶液,300min后吸光度分别为0.590、0.731、0.772、0.376、0.342,说明红曲色素乙醇溶液在pH5~7时基本趋于稳定,而强酸、强碱都会使红曲色素色价发生变化,其中强碱的破坏作用更大,这与Jung等^[20]的研究结果一致。Jung等^[20]发现,随着pH值的改变红曲色素乙醇溶液特征吸收峰的吸收强度会发生改变,吸收峰强度的增加或减弱主要是由于发色团的增色或减色转移造成的,在酸性环境下红曲色素的特征吸收峰发生红移,碱性环境下红曲色素特征吸收峰发生蓝移,红曲色素发色团特征吸收峰红移是红曲色素稳定性较高的原因。强酸、强碱能够破坏红曲色素发色团,主要是破坏红曲色素的R侧链,使其从发色团中解

离下来,使红曲红色素向黄色素和橙色素转变,使红曲色素溶液在不同pH值条件下放置一定时间后其溶液呈现不同的色调(图4)。

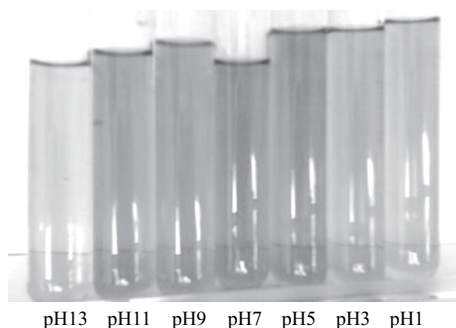


图4 pH值对红曲色素溶液色调的影响

Fig.4 Effect of pH on the hue of *Monascus* pigment solution

2.4 不同光照条件对红曲色素稳定性的影响

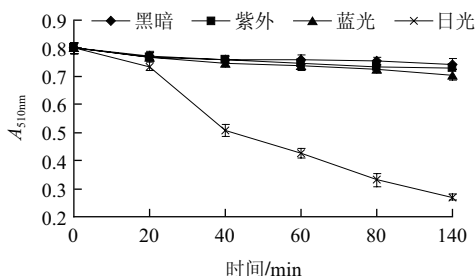


图5 不同光照条件对红曲色素稳定性的影响

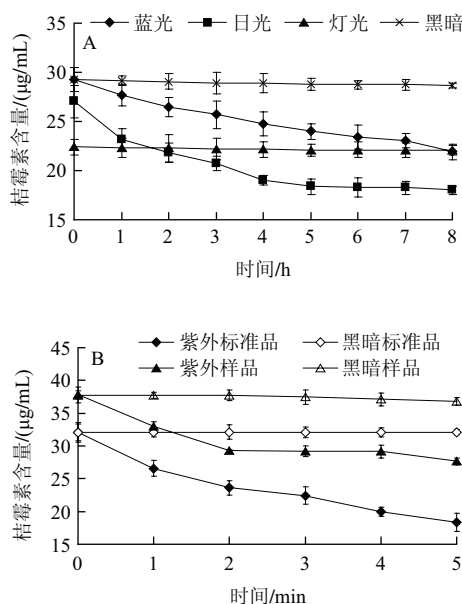
Fig.5 Effect of light sources on the stability of *Monascus* pigments

由图5可知,起始吸光度均为0.800的红曲色素乙醇溶液经黑暗、紫外和蓝光处理140min后,吸光度分别为0.743、0.730和0.705,红曲色素色价降解率分别为7%、9%、12%,在日光照射下,红曲色素溶液的吸光度随着时间的延长急剧降低,20、40、60、80min后红曲色素溶液510nm波长处的吸光度分别为0.735、0.506、0.427和0.331,80min后红曲色素色价降解率为67%;80min后,红曲色素色价的降解趋势趋缓,80~140min,吸光度由0.331降至0.270,这说明在光照条件下红曲色素溶液的质量浓度越大降解的越快,在较低质量浓度时降解的较慢。由以上分析可知,红曲色素乙醇溶液在光照条件下的稳定性为:黑暗>紫外>蓝光>日光。在较强的日光照射条件下,红曲色素的稳定性很差,Jung等^[21]发现,经日光照射后红曲红色素的R侧链(C_5H_{11} 和 C_7H_{15})断裂,通过对红曲红色素经日光照射后物质分子质量的分析得知,红曲红色素通过色素的降解及合成反应在日光下主要形成5种成分,但没有对5种成分的具体组成进行研究。Jung等^[20]通过红曲红色素光降解后红曲色素颜色的变化得知,随着光照时间的延长,红曲色素溶液的亮度值(L^*)及红度值(a^*)减少,红曲红色素向红曲黄色素和红

曲橙色素转变。由此可见,在日光条件下红曲色素稳定性较差的主要原因是由于红曲色素是一种混合色素,其发色团在可见光区及非可见光区很大范围内都有吸收,在光照较强时,红曲色素发色团吸收光子后,使其发生降解及合成反应,使红曲色素发色团的结构发生破坏。

2.5 光照对桔霉素的降解作用

通过外标法对桔霉素含量进行定量测定,其线性回归方程为 $y=0.0173x-0.036$ ($R^2=0.9993$)。分别将桔霉素标准品的甲醇溶液及红曲米的乙醇提取液置于蓝光、日光、紫外光、白炽灯光、黑暗条件下,测定不同条件下桔霉素的含量变化。其结果如图6所示。



A. 蓝光、日光、白炽灯光及黑暗条件对桔霉素标准品稳定性的影响; B. 紫外光及黑暗条件对桔霉素标准品及红曲米提取液中桔霉素稳定性的影响。

图6 光照对桔霉素稳定性的影响

Fig.6 Effect of light on the stability of citrinin

由图6A可知,日光、蓝光对桔霉素具有一定的破坏作用,但需要较长时间,8h后桔霉素保存率分别为64%和76%,1h后其保存率分别为85%和96%,而白炽灯光照射及黑暗条件下桔霉素的含量在8h内几乎没有变化,说明桔霉素能够吸收可见光主要是短波长可见光及紫外光的能量,从而对桔霉素结构造成破坏,这与Schmidt-Heydt等^[18]的研究结果一致。他们研究发现,由于桔霉素在330nm波长处有最大吸收峰,所以能够吸收蓝光、紫外光等的光量子,从而使桔霉素彻底被降解,而波长较长的红光、黄光对桔霉素基本没有降解作用,但有关蓝光、紫外光对桔霉素降解的具体结构变化还有待于进一步研究。蓝光、紫外光还可以使桔霉素溶液中产生一些氧化自由基,而这些氧化自由基可以与桔霉素发生反应,破坏桔霉素的分子结构,从而达到降解桔霉素的目的^[17]。由图6B可知,当用

紫外光照射桔霉素标准品溶液及红曲米提取液时,发现5min内桔霉素的保存率分别为56%和71%,说明紫外光在短时间内能够迅速破坏桔霉素的结构^[18],从而使其在红曲发酵产物中的含量迅速减少,这为物理法降解桔霉素提供了一条新的有效方法。

3 结 论

通过对不同理化因子(乙醇体积分数、酸碱度、温度、光照等)对红曲色素乙醇溶液稳定性的影响可知,红曲色素的稳定性会随着溶剂中乙醇体积分数的增大而提高,当乙醇体积分数达到80%时红曲色素的稳定性最强;当温度为70℃以下时红曲色素较稳定,80、100℃时100min后其色价分别降低30%和56%;当红曲色素乙醇溶液的pH值为5~7时,红曲色素较稳定,而长时间的强酸(pH2)、强碱(pH9~11)处理会对红曲色素色价产生影响;不同光源对红曲色素稳定性影响不同,日光对红曲色素的破坏作用最大,黑暗、紫外和蓝光照射条件下红曲色素的稳定性在140min内无显著差异。日光、蓝光、白炽灯光短时间处理对桔霉素标准品的稳定性无明显影响,但长时间用蓝光、日光照射桔霉素标准品溶液也会使桔霉素含量降低;紫外光处理5min后,桔霉素标准品及红曲米提取物中桔霉素的保存率分别为56%和71%,说明用紫外灯短时间照射能够明显减少发酵产物中桔霉素的含量。

参考文献:

- [1] 刘少伟,阮赞林. 火红的辣椒色背后[J]. 质量与标准化, 2012(17): 34-35.
- [2] KLETER G A, GROOT M J, POELMAN M, et al. Timely awareness and prevention of emerging chemical and biochemical risks in foods: proposal for a strategy based on experience with recent cases[J]. Food and Chemical Toxicology, 2009, 47: 992-1008.
- [3] 林艳华. 儿童食品中几种常见添加剂的危害[J]. 中国卫生产业, 2012, 9(1): 187.
- [4] ABDEL-RAHMAN A, ANYANGWE N, CARLACCI L, et al. The safety and regulation of natural products used as foods and food ingredients[J]. Toxicological Science, 2011, 123(2): 333-348.
- [5] 惠秋沙. 天然色素的研究概况[J]. 北方药学, 2011, 8(5): 3-4.
- [6] 杨晓君, 杨成龙, 何志刚, 等. 红曲霉深层液态培养的研究进展[J]. 福建农业学报, 2010, 25(6): 796-800.
- [7] MAPARI S A S, THRANE U, MERER A S. Fungal polyketide azaphilone pigments as future natural food colorants[J]. Trends in Biotechnology, 2010, 28(6): 300-307.
- [8] LEE C L, PAN T M. Development of *Monascus* fermentation technology for high hypolipidemic effect[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2012, 94(6): 1449-1459.
- [9] GHEITH O, SHEASHAA H, ABDELSALAM M, et al. Efficacy and safety of *Monascus purpureus* Went rice in subjects with secondary hyperlipidemia[J]. Clinical and Experimental Nephrology, 2008, 12: 189-194.
- [10] HONG S, LEE I, KIM S, et al. Improved functionality of soft soybean curd containing *Monascus* fermented soybean ethanol extract[J]. Food Science and Biotechnology, 2012, 21(3): 701-707.
- [11] LEE B H, HSU W H, LIAO T H, et al. The *Monascus* metabolite monascin against TNF- α -induced insulin resistance via suppressing PPAR- γ phosphorylation in C2C12 myotubes[J]. Food and Chemical Toxicology, 2011, 49: 2609-2617.
- [12] ZHENG Yunquan, XIN Yanwen, SHI Xianai, et al. Anti-cancer effect of rubropunctatin against human gastric carcinoma cells BGC-823[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2010, 88(5): 1169-1177.
- [13] HSU W H, PAN T M. *Monascus purpureus*-fermented products and oral cancer: a review[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2012, 93(5): 1831-1842.
- [14] WUA T S, YANG J J, YUB F Y, et al. Evaluation of nephrotoxic effects of mycotoxins, citrinin and patulin, on zebrafish (*Danio rerio*) embryos[J]. Food and Chemical Toxicology, 2012, 50(12): 4398-4404.
- [15] HAN Qingqing, YU Linbo, GUO Yunqian, et al. Toxic effects of citrinin on the male reproductive system in mice[J]. Experimental and Toxicologic Pathology, 2012, 64: 465-469.
- [16] SILVEIRA S T, DAROIT D J, SANT'ANNA V, et al. Stability modeling of red pigments produced by *Monascus purpureus* in submerged cultivations with Sugarcane Bagasse[J]. Food Bioprocess Technol, 2013, 6: 1007-1014.
- [17] HAJJAJ H, GOMA G, BLANC P J, et al. Medium-chain fatty acids affect citrinin production in the filamentous fungus *Monascus ruber*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66: 1120-1125.
- [18] SCHMIDT-HEYDT M, CRAMER B, GRAF I, et al. Wavelength-dependent degradation of ochratoxin and citrinin by light *in vitro* and *in vivo* and its implications on *Penicillium*[J]. Toxins, 2012, 4: 1535-1551.
- [19] CARVALHO J C D, OISHI B O, PANDEY A, et al. Biopigments from *Monascus*: strains selection, citrinin production and color stability[J]. Brazilian Archives of Biology and Technology, 2005, 48: 885-894.
- [20] JUNG H, KIM C, SHIN C S. Enhanced photostability of monascus pigments derived with various amino acids via fermentation[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005, 53: 7108-7114.
- [21] JUNG H, CHOE D, NAM K Y, et al. Degradation patterns and stability predictions of the original reds and amino acid derivatives of monascus pigments[J]. European Food Research and Technology, 2011, 232: 621-629.